



TITLE:

Identification of Genotoxic Compounds Using Isogenic DNA Repair Deficient DT40 Cell Lines on a Quantitative High Throughput Screening Platform(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Nishihara, Kana

CITATION:

Nishihara, Kana. Identification of Genotoxic Compounds Using Isogenic DNA Repair Deficient DT40 Cell Lines on a Quantitative High Throughput Screening Platform. 京都大学, 2016, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19588>

RIGHT:

許諾条件により本文は2016-08-05に公開

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	西 原 佳 那
論文題目	Identification of Genotoxic Compounds Using Isogenic DNA Repair Deficient DT40 Cell Lines on a Quantitative High Throughput Screening Platform (DNA 損傷修復欠損 DT40 細胞を用いた定量的ハイスループットスクリーニングによる遺伝毒性物質の同定)		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>【背景と目的】 ヒトの健康を損なう恐れのある化学物質による環境の汚染を防止することは、我々の生命を維持するために欠かすことができない。化学物質の有害性のなかで最も重要なものは、遺伝毒性である。遺伝毒性を持つ化学物質は、DNA 損傷を引き起こし、発ガンの原因にもなる。有害な化学物質を規制するための法律である化審法では、化学物質の遺伝毒性の評価に、Ames 試験などを採用している。しかし、これらの評価方法は、一度に処理できるサンプル数が限られており、また、感度と特異度が限られている。このため、ハイスループットスクリーニングに適した、化学物質の遺伝毒性評価系の確立が急務である。そこで本研究は、DNA 損傷修復酵素を人工的に欠損させた細胞で、遺伝毒性をハイスループットに感度よく検出するバイオアッセイを樹立することを目指した。</p> <p>【方法】 ニワトリ B リンパ球細胞株 DT40 の野生型と 2 種類の DNA 修復欠損株（<i>REV3^{-/-}</i>と <i>KU70^{-/-}/RAD54^{-/-}</i>細胞）を用いてスクリーニングを行った。一次スクリーニングではハイスループットスクリーニング系を用いて、8000 種類以上の医薬品や環境化学物質などから構成されるケミカルライブラリーに野生型と 2 種類の DNA 修復欠損細胞株を 40 時間暴露し、生存率を野生型と 2 種類の DNA 修復欠損株とで比較した。化学物質に暴露しない細胞の生存率を 100%とし、細胞の生存率を 50%に低下させる化学物質の濃度(IC₅₀)を野生型と DNA 修復欠損株とで比較した。DNA 修復欠損株は野生型と比較して、DNA 損傷を修復する能力が低下している。このため、ある化学物質が、野生型の IC₅₀ と比較して、DNA 修復欠損株の IC₅₀ を有意に低下させる場合、その化学物質は DNA 損傷を誘導していると推測できる。一次スクリーニングで得られたデータを解析し、野生型の IC₅₀ と比較して、有意に DNA 修復欠損株の IC₅₀ を 3 倍以上低下(<i>P</i>< 0.05)させる薬剤、119 種類を選び出した。さらに、一次スクリーニングの結果を確認するために、一次スクリーニングから選び出された 119 種類の化学物質を対象に、一次スクリーニングと同様の方法を用いて二次スクリーニングを行った結果、63 種類の薬剤が遺伝毒性を持つ可能性のある化学物質として選び出された。また、スクリーニングの結果、選ばれた化学物質が本当に遺伝毒性を持つか否かを確認するために、スクリーニングで選ばれた 63 種類の薬剤の一部を対象に DT40 細胞を用いた γH2AX 免疫染色、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO 細胞）を用いた小核試験をおこなった。γH2AX 免疫染色は、DNA 損傷の発生を顕微鏡下で可視化することで化学物質の遺伝毒性を確認することができる。小核試験は、DNA 損傷に起因する細胞質中の小核の出現頻度を測定することで、化学物質による遺伝毒性を判定できる。</p> <p>【結果】 本研究の結果、すでに市場に流通し遺伝毒性が報告されている化学物質</p>			

だけでなく、これまでに遺伝毒性が報告されていない 3 種類の化学物質（2-オキシランメサナミン、AD-67、テトラフェニルオレサングリシジルエサー）の遺伝毒性を同定した。

【考察】 本研究から、DT40 細胞株を用いたスクリーニングでは多数の化学物質を一度で処理することができ、ハイスループットスクリーニングに適することが明らかになった。また、DT40 細胞株を用いたハイスループットスクリーニングと小核試験や γ H2AX 免疫染色を組み合わせることにより、短時間で、かつ確実に化学物質の遺伝毒性を評価できることが示された。

（論文審査の結果の要旨）
本論文では、ニワトリ DT40 細胞を用いて、化学物質の遺伝毒性をハイスループットにスクリーニングする新たな方法を樹立することを目指して研究を行った。本研究は、米国 Toxicology in the 21st century のプロジェクトチームと共同で行った。その結果次のことが明らかになった。

1. 新たな方法では、野生型と DNA 損傷修復欠損細胞の生存率を比較することで、DNA に損傷を誘導する化学物質を特異的に選び出せる。
2. これまでに遺 伝 毒 性 について 報 告 の な かつ た 3 種 類 の 化 学 物 質（2-Oxiranemethanamine、AD-67、 Tetraphenylolethane glycidyl ether）について、遺伝毒性があることを明らかにした。
3. 今回のスクリーニングではラット肝臓ホモジネートの 9,000×g 上清（S9）を使用していない。このため、遺伝毒性を持つ化学物質のうち、代謝活性物が遺伝毒性を発揮する化学物質は見落としていることが考えられる。今後、S9 をスクリーニングで使えるように改善していく。

以上の研究は、化学物質のスクリーニング試験の新たな開発に貢献し、化学物質の遺伝毒性研究の発展に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 2 8 年 1 月 2 5 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。